● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره دهم، شمارهٔ ۵، آذر – دی ۱۳۸۷، صفحه ۲۹-۲۳

پروتئین ki67 و p53 در ادنتوژنیک کراتوسیست

صفورا سیفی*[۱]، سلیمان محجوب[۲]، انسیه شفیق[۳]، علی بیژنی[۴]، محمدحسن آهنگری[۵]

۱- استادیار گروه آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳- استادیار گروه پاتولوژی عمومی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۴- پزشک عمومی ۵- دانشجوی دندانپزشکی

سابقه و هدف: پروتئین Ki67 نشانگر پرولیفراسیون در سلولهای در حال تکثیر و P53 یک مهار کننده سرطانی می باشد. ضمنا دلائل عود بالای کراتوسیست، ناشناخته باقی مانده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی واکنش ایمنی شاخص تکثیر سلولی Ki67 و نیز P53 در لایه های مختلف و کل پوشش اپی تلیوم ادنتوژنیک کراتوسیست انجام شده است.

مواد و روشها: مطالعه به صورت توصیفی بر روی ۲۰ بلوک پارافینه ادنتوژنیک کراتوسیست انجام گرفت. از بلوکهای پارافینه برش هایی ۳ µm جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگرهای Ki67 و P53 به کمک آنتی بادی های Anti ki67 و Anti P53 انجام شد. تعداد هسته سلولهای رنگ گرفته در لایه های مختلف اپی تلیوم پوشاننده کراتوسیست در ۱۰۰۰ سلول اپی تلیال پشت سرهم در ۱۰ فیلد میکروسکوپی شمرده شد و با یکدیگر مقایسه گردید.

یافته ها: تعداد هسته سلولهای رنگ پذیر شده با نشانگر Ki67 به ترتیب در لایه بازال، میانی و سطحی و در کل پوشش اپی تلیالی آن ٤/٤ ±١٤/٣٪، ١٢/٨±٤١/٤٪، ٠ و ٦/١±١٨/٥٪ بود. میانگین رنگ پذیری هسته سلولهای اپی تلیالی با نشانگر P53 به ترتیب در لایه بازال، میانی و سطحی و در کل پوشش اپی تلیالی آن ٣/٢±١١/٧٪، ٧/٦±٢٣/٩٪، ٠ و ٣/٦±١١/٨٪ بود. میانگین تعداد هسته سلولهای رنگ پذیر با هر کدام از نشانگرهای Ki67 و p53 فقط در لایه های مختلف اپی تلیوم کیست در ارتباط بود (p<٠/٠٠٠١). ارتباط معنی داری بین میانگین تعداد هسته سلولهای رنگ پذیری با نشانگرهای Ki67 و P53 در لایه میانی کیست مذکور دیده شد.

نتیجه گیری: مطالعه نشان داد که رنگ پذیری بالاتر با نشانگرهای Ki67 و P53 در لایه های میانی نسبت به لایه های بازال و سطحی اپی تلیوم و در کل پوشش آن، نشان دهنده خروج سلولهای اپی تلیالی کیست از چرخه نرمال سلولی و توجیه کننده تمایل به عود بالا و رفتار تهاجمی آن است. همچنین می توان از بیان بالای نشانگرهای Ki67 و P53 در لایه های میانی جهت تمایز کیستهای ادنتوژنیک با خاصیت تهاجمی بالا از سایر موارد استفاده کرد.

واژه های کلیدی: *پروتئین*، **Ki67**، **P53**، *کیستهای ادنتوژنیک*، *ایمونوهیستوشیمی*، *تکثیر سلولی*.

دریافت: ۸۶/۹/۱۷، ارسال جهت اصلاح: ۸۷/۴/۱۹، پذیرش: ۸۷/۶/۲۷

مقدمه

ادنتوژنیک کراتوسیست یک کیست ادنتوژنیک تکاملی نسبتاً شایع است که از بقایای تیغه دندانی منشا می گیرد و تقریباً در ۴۰-۲۵٪ موارد مرتبط با تاج دندان نهفته یا نیمه نهفته می باشد (۱). ماهیت واقعی این کیست و دلایل عود بالای آن به طور اساسی ناشناخته باقی مانده است (۳و۲). کیست مذکور مکانیسم رشدی و رفتار بیولوژیکی متفاوتی نسبت به سایر کیست های ادنتوژنیک دارد. رشد آن ممکن است به دلیل وجود فاکتورهای ناشناخته ذاتی در اپی تلیوم یا فعالیت آنزیمی بافت فیبروی جدار کیست یا محتویات مایع درون کیست باشد (۴و۱). آنتی ژن Ki67 پروتئین غیر هیستونی ۳۹۵ کیلو دالتونی است که وابسته به هسته سلول بوده و توسط سلولهای موجود در فازهای G1 و G2 و M و S چرخه سلولی بارز شده و بلافاصله بعد از تقسیم میتوزی از بین می رود (۵). P53 یک ژن مهار کننده سرطانی است که روی بازوی کوتاه

▣ این پژوهش، پایان نامه محمد حسن آهنگری دانشجوی دوره دندانپزشکی عمومی دانشگاه علوم پزشکی بابل بوده و هزینه انجام آن در قالب طرح شماره۱۸٤٥۲۱٥۸٦ از اعتبارات دانشگاه تأمین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]

کروموزوم ۱۷ قرار داشته و محصول آن که یک فسفونوکلئوپروتئین است با اتصال به DNA از پیشرفت تقسیم سلولی از G1 به S جلوگیری می کند (۶). موتاسیون در این ژن بسیار معمول بوده و می تواند پروتئین پایدارتری را ایجاد کند که از میتوز جلوگیری نکرده و با تجمع در هسته سلول ها با روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در بسیاری از تومورها تشخیص داده شود (۷). Kichi و همکاران با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، رنگ پذیری با نشانگر Ki67 را در لایه های بازال، میانی و سطحی کراتوسیست به ترتیب ۱۶٪، ۳۶٪ و ۴٪ و رنگ پذیری با نشانگر P53 را در لایه های بازال، میانی و سطحی کراتوسیست به ترتیب ۶۶٪، ۷۲٪ و ۴۵٪ مطرح کردند و رنگ پذیری بالاتر با نشانگرهای فوق را در لایه های مختلف و بویژه در لایه میانی کراتوسیست نسبت به کیست دنتی ژورس گزارش نمودند (۸). از آنجا که دلایل رفتار تهاجمی و تمایل به عود بالای کراتوسیست نسبت به کیست های ادنتوژنیک دیگر کاملاً شناخته شده نیست، هدف از این بررسی مقایسه واکنش ایمونوهیستوشیمیایی از نظر بیان پروتئین Ki67 و P53 در لایه های مختلف پوشش اپی تلیوم و کل پوشش اپی تلیالی ادنتوژنیک کراتوسیست می باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه گذشته نگر و توصیفی کلیه نمونه های بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی فک و دهان و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل در فاصله سالهای ۸۶–۸۲ با تشخیص ادنتوژنیک کراتوسیست مورد بررسی قرار گرفتند. برای تکمیل نمونه ها از بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل در فاصله سالهای ۸۶–۷۰ استفاده شد و جمعاً ۲۰ نمونه ادنتوژنیک کراتوسیست انتخاب شد. بلوکهای پارافینه از بایگانی خارج و اطلاعات بالینی در مورد (سن، جنس، محل ضایعه) از پرونده های بیماران استخراج گشت. آن گاه از هر بلوک برش ۴ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی شده و مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. بلوک های مناسب محتوی حداکثر طول اپی تلیوم کیست ها انتخاب و از هر یک برش ۳ میکرونی تهیه شد و ایمونوهیستوشیمی با روش استاندارد Avidine Biotin Peroxidase انجام گرفت. قبل از شروع روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بر روی ۱۵ بلوک پارافینه شامل (کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان، داکتال کارسینومای پستان و ادنتوژنیک کراتوسیست) که به دو گروه ۷ و ۸ تایی تقسیم شدند، در زمانهای متفاوت انکوباسیون آنتی بادی اولیه (´۱۰و ´۳۰ و ´۶۰) و pH مختلف مربوط به بافر سیترات (۵/۶–۷/۴–۸/۶) امتحان گردید و در نهایت بهترین شرایط برای روش مذکور انتخاب و ایمونوهیستوشیمی به روش توصیف شده در ذیل بر روی بلوک های پارافینه انجام شد. در ابتدا برش ها را به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در فور ۳۸ درجه سانتیگراد و سپس ۲۰ دقیقه در فور ۸۰ درجه سانتیگراد قرار دادند. سپس برش ها دوبار در گزیلن برای دپارافینه و سپس در درجات مختلف اتانل به ترتیب (۱۰۰٪ و ۹۶٪ و ۸۰٪ و۷۰٪) قرار داده شدند. جهت آشکارسازی آنتی ژنهای بافتی، برش ها در بافر سیترات (pH=6 10µm) به مدت ۲۰ دقیقه در اتو کلاو (۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند و بعد از این مرحله و رسیدن به دمای آزمایشگاه و شستشو با بافر (pH= ۷/۴) (Phosphate Buffered Saline, PBS)، برای حذف فعالیت پراکسیداز با منشا داخلی، محلول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد.

همچنین به منظور حذف اتصالات غیر اختصاصی آنتی بادی با آنتی ژن های بافتی، از معرف بلاکینگ شرکت Dako استفاده شد. در مرحله بعد برش ها با آنتی بادی های منوکلونال Anti Ki67 (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) و Anti P53 (P53 Do 7, Dako) به رقت $\frac{۱}{۱۰۰}$ در ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شده و مجدداً توسط PBS شسته شدند. بعد از انکوبه شدن با آنتی بادی بیوتینه شده (شرکت Dako) بمدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و شست و شوی مجدد با PBS در نهایت محلول Streptavidin Horseradish Peroxidase به برش ها اضافه شده و عمل شستشو با PBS بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه انجام گرفت و سپس کروموژن DAB ´۳ و ۳ (دی آمینوبنزیدین دی هیدروکلراید) بعنوان سوبسترای آنزیم به برش ها اضافه گردید تا واکنش رنگی ایجاد شود. بعد از مراحل شستشو و توقف واکنش از رنگ هماتوکسیلین مایرز جهت رنگ آمیزی زمینه استفاده شد و سپس عمل رطوبت گیری با درجات مختلف اتانل از رقیق به غلیظ ۱۰۰٪ انجام گرفت و برش ها ۲ بار در گزیلن قرار گرفته و در نهایت با لامل پوشیده شدند. بعنوان کنترل منفی از بافر PBS (pH=۷/۴) بجای آنتی بادی منوکلونال

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]

استفاده گردید و کنترل مثبت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در نظر گرفته شد. تمامی اسلایدهای رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری Olympus (Bx41) با بزرگ نمایی ۴۰ برابر مشاهده شدند. قسمت هایی از جدار کیست که شامل ۱۰۰۰ سلول اپی تلیالی پشت سر هم در یک سطح بودند، انتخاب و شمارش تعداد هسته سلولهای رنگ گرفته در کل ضخامت اپی تلیوم و به طور جداگانه در لایه های بازال (شامل طبقه بازال و دو ردیف بالای آن)، میانی (شامل سلولهای گرد بزرگ که بین لایه بازال و سطحی هستند) و سطحی (شامل سلولهای چند وجهی یا صاف شامل یک تا سه لایه که فقط زیر سطح اپی تلیوم هستند) اپی تلیوم جدار کیست انجام شد. به منظور جلوگیری از خطاهای شمارش کننده، هر مقطع دو بار با لنز مدرج چشمی شمرده شده و در نهایت نتایج شمار ش به صورت میانگین درصد هسته سلولهای رنگ پذیر شده ارائه شد.

اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزاری آماری SPSS و آزمون های من ویتنی، مجذور کای، تست دقیق فیشر و همبستگی پیرسون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

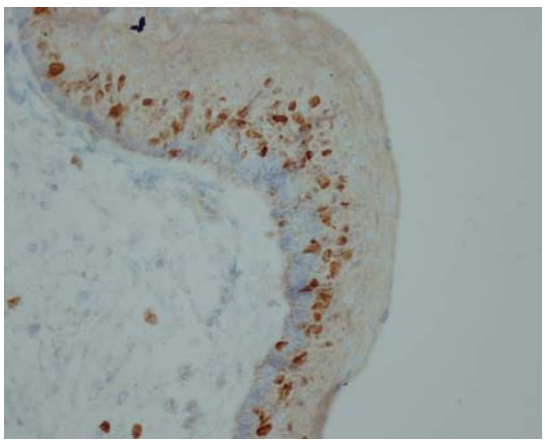
یافته ها

از بین بلوکهای پارافینه موجود در آزمایشگاه آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی و بیمارستان شهید بهشتی بابل مربوط به نمونه های دهانی، ۲۰ مورد ادنتوژنیک کراتوسیست انتخاب شده که ۱۴ مورد درجنس مذکر و ۶ مورد در جنس مونث بود. سن بیماران از ۱۸ تا ۶۴ سال (۱۳/۲±۳۴/۵) بود. ۱۶ نمونه ادنتوژنیک کراتوسیست در خلف فک پایین و ۴ نمونه در فک بالا بودند.

بررسی پاتولوژیکی رنگ آمیزی لام های هماتوکسیلین – ائوزین و مشاهده آنها زیر میکروسکوپ نشان داد که ضخامت نازک و یکنواخت لایه های اپی تلیالی کیست شامل ۶ – ۱۰ لایه سلولی با لایه بازال به خوبی پلاریزه و تمایل لایه اپی تلیالی به جدا شدن از بافت همبندی زیرین و سطح لومن پاراکراتینیزه که معمولاً مواج بود، وجود دارد. در مواقعی که التهاب در بافت همبندی کیست دیده شد، پوشش اپی تلیوم کیست با طرح کلاسیک (سنگفرشی مطبق پاراکراتینیزه) به اپی تلیوم سنگفرشی غیر کراتینیزه تبدیل شد که مشابه کیستهای التهابی دیگر نمایان بود. در رنگ آمیزی با آنتی بادی Ki67 و P53 رنگ قهوه ای یکنواخت در هسته سلولهای اپی تلیالی لایه بازال و میانی ادنتوژنیک کراتوسیست مشاهده شد که تعداد هسته سلولهای رنگ پذیر شده با نشانگر Ki67 در ناحیه بازال (۴/۴±۱۴/۳٪) و در لایه های میانی (۱۲/۸±۴۱/۴٪) و در لایه های سطحی صفر بود. میانگین تعداد هسته سلولهای اپی تلیالی رنگ پذیر شده با نشانگر Ki67 در کل ضخامت کیست مذکور (۶/۱±۱۸/۵٪) بود. بین میانگین تعداد هسته سلولهای رنگ پذیر شده با نشانگر ki67 در لایه های بازال و میانی و سطحی اختلاف معنی داری وجود داشت ($p= ۰/۰۰۱$). به عبارت دیگر تراکم بیشتری از سلولهای Ki67 مثبت در ناحیه میانی ادنتوژنیک کراتوسیست مشاهده شدند (تصویر شماره ۱).

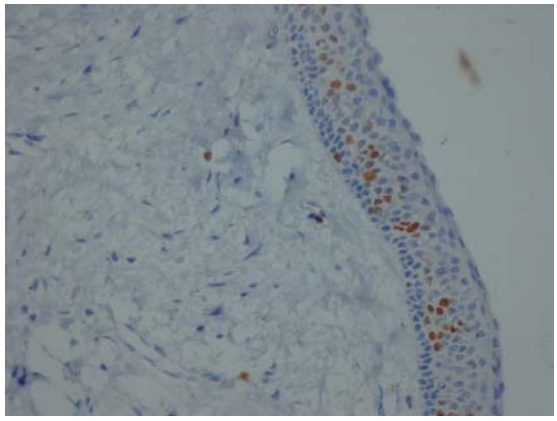
در رنگ آمیزی با نشانگر P53 تعداد هسته سلولهای رنگ پذیر شده با نشانگر P53 در لایه بازال (۳/۲±۱۱/۷٪)، میانی (۷/۶±۲۳/۹٪)، سطحی صفر بود. میانگین تعداد هسته سلولهای رنگ پذیر شده با نشانگر P53 در کل ضخامت اپی تلیوم کیست مذکور (۳/۶ ±۱۱/۸٪) بود. بین میانگین تعداد هسته سلولهای اپی تلیالی رنگ پذیرشده با نشانگر P53 در لایه های مختلف اپی تلیوم ادنتوژنیک کراتوسیست اختلاف معنی داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$) (تصویر شماره ۲).

در لایه بازال ادنتوژنیک کراتوسیست ضریب همبستگی مثبت (ارتباط بین Ki67 و P53) برابر با ۰/۳۸۵ بود. اما اختلاف آماری معنی داری از نظر بیان دو نشانگر مذکور مشاهده نشد. در لایه میانی کیست مذکور ضریب همبستگی مثبت بین نشانگرهای Ki67 و P53 برابر با ۰/۲۶۰ بود. اما اختلاف آماری معنی داری بین بیان نشانگرهای مذکور در ادنتوژنیک کراتوسیست مشاهده نشد.



تصویر شماره ۱. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر Ki67 در ادنتوژنیک کراتوسیست ۴۰ ×

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]



تصویر شماره ۲. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر P53 در ادنتوژنیک کراتوسیست ۴۰ ×

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر رنگ پذیری با نشانگر Ki67، بیشتر در هسته سلولهای لایه میانی (۱۲/۸±۴۱/۴٪) ادنتوژنیک کراتوسیست مشاهده شد. در حالی که سلولهای لایه بازال میزان رنگ پذیری کمتری (۴/۴±۱۴/۳٪) را نسبت به لایه های میانی نشان دادند که نتایج این مطالعه مشابه مطالعات دیگری است که رنگ پذیری با نشانگرهای پرولیفراسیون ki67 و PCNA را در لایه های میانی ادنتوژنیک کراتوسیست گزارش کردند (۱۱-۹). رنگ پذیری با نشانگر Ki67، نشان دهنده فعالیت تکثیری بالای سلول های اپی تلیالی است(۱۲). سلول های لایه بازال به عنوان سلولهای پیش ساز یا Stem Cell در نظر گرفته می شوند و انتظار می رود که این سلول ها فعالیت تکثیری و رنگ پذیری بیشتری با نشانگر Ki67 نشان دهند در حالی که در مطالعه مذکور سلولهای ناحیه میانی فعالیت بالای پرولیفراسیون را نشان دادند که میزان زیاد این فعالیت تکثیری در لایه های میانی ادنتوژنیک کراتوسیست می تواند بیان کننده اختلال ایجاد شده در کنترل نرمال چرخه سلولی پوشش اپی تلیالی این کیست و توجیه کننده پتانسیل رشدی بالا و رفتار تهاجمی آن باشد (۱۳).

Kim و همکاران مطرح کردند که ادنتوژنیک کراتوسیست دارای پروسه پرولیفراسیون و تمایز منحصر به فردی است و بیان نشانگر Ki67 مرتبط با عود ادنتوژنیک کراتوسیست نمی باشد بلکه عدم خروج کامل اپی تلیوم کیست، یا فاکتورهای موثر دیگر نسبت به عواملی که در رشد یا آپوپتوز آن نقش دارند، عامل اصلی در عود این کیست است (۱۴). در مطالعات دیگری گزارش شد که آزادسازی کلاژناز، پروستاگلاندین و آنزیم های اکسیداتیو با فعالیت بالا ممکن است در عود ادنتوژنیک کراتوسیست موثر باشد (۱۵).

Depaula و همکاران مطرح کردند که فاکتورهای رشدی و سایتو کاین های آزاد شده ناشی از ارتشاح سلولهای التهابی ممکن است عامل فعالیت پرولیفراتیو بالای ادنتوژنیک کراتوسیست باشد (۱۱). اما مطالعات دیگری این فرضیه را تایید نکردند (۱۴). این تفاوت ها، ممکن است به دلیل اختلاف در نحوه شمارش سلولی، موضع شمارش سلولی، استفاده از بافت تازه یا ثابت شده در فرمالین یا حجم نمونه باشد.

Shear و همکاران با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان بالاتر نشانگرهای Ki67 و PCNA و P53 را در ادنتوژنیک کراتوسیست سندرمیک نسبت به غیر سندرومیک یافتند و نقش عمده نشانگرهای فوق را در پاتوژنز این کیست تایید کردند (۱۲). پروتئین P53 متوقف کننده پرولیفراسیون و تکثیر سلولی است. ژن P53 دارای نیمه عمر کوتاهی در سلولهای نرمال است و با روش ایمونوهیستوشیمی نوع Wild آن تشخیص داده نمی شود (۴). در مطالعه مذکور میزان بیان بالای این پروتئین در هسته سلولهای اپی تلیالی لایه های میانی ادنتوژنیک کراتوسیست مشاهده شد در حالی که میزان آن در لایه بازال اندک بود و فقط تعداد کمی از هسته سلولهای اپی تلیالی رنگ پذیری با نشانگر مذکور را نشان دادند. افزایش بیان P53 در لایه های میانی، بیان کننده فعالیت نوع موتانت آن بوده که موجب فعالیت پرولیفراسیون بالای این کیست می گردد و با روش ایمونوهیستوشیمی تشخیص داده می شود. در صورتی که در لایه بازال این کیست سطوح پایین بیان آن ممکن است، مطرح کننده نوع Wild یا بیان کننده نوع فیزیولوژیک P53 باشد (۷). که در هر حال نشان دهنده اختلال در کنترل نرمال چرخه سلولی و تمایل به عود بالای این کیست می باشد (۱۳و۴).

Ayia و همکاران با انجام تحقیقاتی بر روی ۴۰ مورد کیست ادنتوژنیک نشان دادند که در ۲۷ مورد بیانP53 مثبت بود و این گونه گزارش کردند که غیر فعال شدن P53 نقشی در پروسه آغاز تشکیل و پیشرفت کیست های ادنتوژنیک دارد (۱۶).

در مطالعه حاضر در ناحیه میانی میزان بیان Ki67, P53 بیشتر از لایه بازال و سطحی بود. با وجود ضریب همبستگی مثبت (۰/۳۸۵) بین بیان Ki67 و P53 در لایه بازال، اختلاف آماری معنی داری از نظر بیان نشانگرهای فوق مشاهده نشد. همچنین در لایه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]

میانی با وجود ضریب همبستگی مثبت ۰/۲۶۰ بین بیان نشانگرهای Ki67 و P53، اختلاف آماری معنی داری از نظر بیان نشانگرهای مذکور دیده نشد. به عبارت دیگر ضریب همبستگی مثبت بیان کننده وجود ارتباط خطی مثبت بین بیان نشانگرهای Ki67 و P53 در لایه های بازال و میانی ادنتوژنیک کراتوسیست است و احتمالاً به دلیل کم بودن تعداد نمونه، اختلاف آماری معنی داری از نظر بیان نشانگرهای فوق در لایه های بازال و میانی ادنتوژنیک کراتوسیست مشاهده نشد. مطالعات دیگر مطرح کردند که افزایش بیان پروتئین P53 موتانت مرتبط با فعالیت پرولیفراسیون در ادنتوژنیک کراتوسیست است. همچنین رنگ پذیری با نشانگر Ki67 در لایه های میانی ادنتوژنیک کراتوسیست همراه با افزایش بیان نشانگرهای EGFR و P53، در مطالعات دیگری مطرح شده که می تواند بیان کننده پروسه پرولیفراسیون و تمایز منحصر به فرد در پوشش ادنتوژنیک کراتوسیست باشد (۱۲و۱۰). Lomuzio و همکاران تحقیقاتی در زمینه بررسی ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین P63 در کیستهای ادنتوژنیک فکی انجام دادند و عنوان کردند که P63 جزیی از خانواده P53 (Tumor Suppressor gene) است و به عنوان نشانگر کمک کننده برای تشخیص کیستهایی با رفتار تهاجمی تر و میزان عود بالاتر استفاده می گردد (۱۷).

در فرایند تکثیر سلولی نیاز به تقسیم سلولها است که تحت کنترل مولکولهای بیان شده در طی چرخه سلولی شامل (P53, Ki67) می باشد. عدم تعادل یا افزایش پرولیفراسیون سلولی در ضایعات مختلفی مثل سرطان و کیست گزارش شده است و میزان رشد ضایعات یکی از راههای تشخیصی تهاجمی بودن آنهاست (۱۹ و ۱۸). از آن جا که میزان رشد پوشش اپی تلیالی در انواع مختلف کیستهای ادنتوژنیک مشاهده شده، فرق می کند، می توان از بیان نشانگرهای ki67 و P53 در لایه میانی (با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی) به عنوان یکی از راههای کمکی جهت افتراق کیستهای ادنتوژنیک با خاصیت تهاجمی از کیست های ادنتوژنیک دیگر استفاده کرد (۲۰). همچنین نتایج این مطالعه حاکی از آن است که نقش عمده در خاصیت تهاجمی و عود ادنتوژنیک کراتوسیست در لایه های میانی اپی تلیوم کیست مذکور می باشد که در سلولهای آن کنترل نرمال چرخه سلولی بهم می خورد و با روش ایمونوهیستوشیمی و استفاده از نشانگرهای ki67 و P53 نمایان است. در مجموع نتایج این مطالعه تایید کننده نقش نشانگرهای Ki67 و P53 در پاتوژنز ادنتوژنیک کراتوسیست می باشد، در حالی که ارتباط آماری معنی داری بین بیان Ki67 و P53 در لایه های بازال و میانی و کل پوشش اپی تلیالی کیست مذکور مشاهده نشد.

امید است در آینده تحقیقات کاملی در مورد تغییرات ژنومی مورد نیاز برای پتانسیل تکثیری سلولهای اپی تلیالی که در تشکیل ضایعات ادنتوژنیک با خاصیت تهاجمی بالا نقش دارند، به عمل آید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل، همکاران آزمایشگاه ایمونوهیستوشیمی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه و خانم گوران تشکر می شود.

****

References

1. Neville BW, Dam DD, Allen CM, Bougaot JE. Oral and maxillofacial pathology, 2nd ed, Philadelphia, WB Saunders 2002; pp: 594-7.

2. Myoung H, Hong SP, Hong SD, et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Ended 2001; 91(3): 328-33.

3. Forssell K, Forssell H, Kahnberg KE. Recurrence of keratocysts. A long-term follow up study. Int Oral Maxillofac Surg 1998; 17(1): 25-8.

4. Piattelli A, Fioroni M, Rubini C. Differentiation of odontogenic keratocyst from other odontogenic cysts by the expression of bcl 2 immunoreactivity. Oral Oncol 1998; 34(5): 404-9.

5. Mahjoub F. Basic of immunohistochemistry, practice, technique, 1st ed, Tehran, Enteshrat Co 1997; pp: 9-10.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]

6. Eslami M, Eshghyar N, Tirgrai F, Rezvani G. [Immunohistochemical study expression of Ki67 in unicystic ameloblastma and dentigerous cyst]. J Tehran Univ Med Sci 2004; 17: 71-4. [Article in Persian]

7. Lombardi T, Odell EW, Morgan PR. P53 immunohistochemistry of odontogenic keratocyst in relation to recurrence, basal cell budding and basal-cell nevus syndrome. Arch Oral Biol 1995; 40(12): 1081-4.

8. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, et al. Cell proliferation, apoptosis and apotosis- related factors in odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. J Oral Pathol Med 2005; 34(5): 280-6.

9. Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle and apoptosis- related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. J Oral Pathol Med 2001; 30(7): 434-42.

10. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunohistochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell Naevus syndrome (BCNS)- associated lesions. J Oral Pathol Med 1995; 24(5): 221-6.

11. De Paula AM, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. J Oral Pathol Med 2000; 29(10): 477-82.

12. Shear M. The aggressive nature of odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? part 2: proliferation and genetic studies. Oral Oncol 2002; 38(4): 323-31.

13. Slootweg PJ. P53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. J Oral Pathol Med 1995; 24(9): 393-7.

14. Kim DK, Ahn SG, Kim J, Yoon JH. Comparative ki-67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. Yonsei Med J 2003; 44(5): 841-6.

15. Harris M, Jenkins MV, Bennett A, Wills MR. Prostaglandin production and bone resorption by dental cysts. Nature 1973; 254(5422): 213-5.

16. Ozveren A, Tuskan C, Yaltrik M, Atalay B, Erseven G. Expression of the tumor suppressor gene P53 in odontogenic cysts. Turk J Med Sci 2003; 33: 243-47.

17. Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, et al. P63 expression in odontogenic cysts. Int J Oral Maxillofac Surg 2005; 34(6): 668-73.

18. Schlephaka H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review. Int J Oral Maxillofac Surg 2003; 32(3): 233-45.

19. Hall PA, Levision DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. J Clin Pathol 1990; 43(3): 184-92.

20. Saracoglu U, Kurt B, Gunhan O, Guven O. MIB-1 expression in odontogenic epithelial rests, epithelium of healthy oral mucosa and epithelium of selected odontogenic cysts. An immunohistochemical study. J Oral Maxillofac Surg 2005; 34: 32-5.

*آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشکده دندانپزشکی، گروه تشخیص، تلفن: ۹-۲۲۹۱۴۰۸-۰۱۱۱

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]

KI67 AND P53 PROTEINS IN ODONTOGENIC KERATOCYST

S. Seifi (DDS)[1*], S. Mahjoub (PhD) [2], E. Shafigh (MD) [3], A. Bijani (MD) [4], M.H. Ahangari (DDS) [5]

1. Assistant Professor of Oral and Maxillofacial Pathology Department, Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. Sf_Seify@yahoo.com, *2. Associate Professor of Biochemistry & Biophysic Department, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, 3. Assistant Professor of General Pathology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, 4.General Practitioner, 5. Dental Student.*

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Ki67 is proliferation marker in proliferative cells and P53 is a tumor suppressor gene. Meanwhile the cause of high recurrence of keratocyst is unknown. The purpose of this study was to evaluate immunostaining reaction of Ki67 (proliferation marker) and P53 (tumor suppressor gene) in different and all layers of odontogenic keratocyst (OKC).

METHODS: This descriptive study was performed on 20 paraffinized blocks. From parafinized blocks, 3-µm section was cutted and then IHC was done for Ki67, P53 markers with anti Ki67 antibody and anti P53 antibody. Nucleus of epithelial cells was immunostained in different layers of OKC in 1000 epithelial cells, in 10 HPF (high power field) were counted and compared to each other.

FINDINGS: Immunostained nucleus of epithelial cells with Ki67 in basal, intermediate and surface layers and all lining epithelium of OKC were 14.3±4.4%, 41.4±12.8%, 0, 18.5±6.1%, respectively. Mean of nucleus immunoreactive epithelial cells with P53 in basal, intermediate, surface layers and all lining epithelium of OKC were 11.7±3.2%, 23.9±7.6%, 0, 11.8±3.6%, respectively. Mean of immunostained nucleus of epithelial cells with Ki67 and P53 markers was statistically significant in different layers of epithelium of OKC ($p<0.0001$). There was a significant relationship between mean of nucleus immunoreactive epithelial cells with Ki67 and P53 in intermediate layer of OKC.

CONCLUSION: According to the results, high immunoreactivity with Ki67 and P53 markers in intermediate layers compared to basal, surface and in all lining epithelium of OKC showed exclusion of epithelial cells from normal cell cycle and tendency to recurrence and aggressive behavior in OKC. Also, high expression of Ki67 and P53 in intermediate layers could be used to differentiate aggressive of odontogenic cysts from other odontogenic cysts.

KEY WORDS: *Ki67 protein, P53 protein, Immunohistochemistry, Odontogenic keratocyst, Cell proliferation.*

Journal of Babol University of Medical Sciences 2008-2009; 10(5): 23-29.

Received: December 7th 2008, Revised: July 9th 2008, Accepted: September 17th 2008.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.3.9]